

Premiers résultats concernant la production d'embryons somatiques à partir de tissus foliaires de cocotier, *Cocos nucifera* L. (1)

C. PANNETIER (2) et J. BUFFARD-MOREL (3)
avec la collaboration technique de D. LIEVOUX

Résumé. — La possibilité d'induction d'une embryogenèse somatique à partir de tissus foliaires de cocotier a été mise en évidence. Des explants de jeunes feuilles, provenant aussi bien d'individus jeunes que d'arbres adultes, ont donné naissance à des cals nodulaires. L'évolution des explants est décrite. La formation d'embryoides a été obtenue, à partir de plants de pépinière et d'arbres de 5 ans, dans un délai minimum de 6 mois après la mise en culture des explants.

INTRODUCTION

La productivité d'une plantation de cocotiers pourrait être augmentée de façon significative si du matériel homogène hautement producteur était disponible. Or, le cocotier généralement allogame n'est multiplié actuellement que par voie sexuée.

Quelques cas exceptionnels de phénomènes pouvant conduire à une multiplication végétative ont été signalés : ramifications, rejets, transformations de spathes ou de fleurs en bourgeons végétatifs [Davis, 1969]. Dans ce dernier cas, des tentatives d'enracinement ont pu aboutir [Sudasrip *et al.* 1978]. Cependant, aucune méthode de multiplication végétative de routine n'a pu être mise au point.

Les techniques de culture *in vitro* ont montré leur efficacité pour la propagation d'un bon nombre d'espèces [Murashige, 1964] ; leur utilisation en vue de la multiplication végétative du cocotier est donc apparue d'un grand intérêt. Des travaux ont d'ailleurs été conduits dans plusieurs pays à partir de différents types d'explants. Nous citerons : les embryons [De Guzman *et al.*, 1971, 1978 ; Noerhadi, 1975] et les fragments de tiges ou d'inflorescences [Eeuwens, 1976 et 1978 ; Apavatirut et Blake, 1977 ; Eeuwens et Blake, 1978 ; De Guzman et Del Rosario, 1979].

Nous présentons ici les premiers résultats de recherches entreprises au début de 1981. Ils portent sur la formation de cals et l'induction d'une embryogenèse somatique à partir de tissus foliaires. Une méthode de ce type a été mise au point précédemment sur palmier à huile [Rabéchault et Martin, 1976 ; puis Ahée *et al.*, 1981].

Nous recherchons à induire la production de néoforma-

tions dans les délais les plus brefs après la mise en culture des explants afin de conduire à une méthode rapide présentant un maximum de garanties quant à la conformité du matériel végétal néoformé. Dans cette optique, des résultats ont été obtenus récemment sur palmier à huile [Pannetier *et al.*, 1981].

RÉSULTATS

Des feuilles jeunes ont été prélevées sur des individus provenant de l'hybride PB-121 (Nain Jaune Malais x Grand Ouest Africain) créé par l'I.R.H.O.

Le prélèvement a été effectué sans léser l'apex, la repousse de l'arbre est ainsi possible et a effectivement été observée. Les explants étaient constitués de fragments de folioles obtenus à partir de deux types principaux d'individus : a) plants de pépinière ou plant de 5 ans qui s'étaient développés en serre, b) arbres adultes choisis pour leurs critères de production. Dans ce dernier cas, le matériel a été prélevé en Côte-d'Ivoire sur la station cocotier Marc-Delorme et expédié en France dans les plus brefs délais.

Quatre cents explants par plant de pépinière, 800 pour l'individu âgé de 5 ans et plus de 1 200 par arbre adulte ont pu être mis en culture.

Un ensemble de conditions de culture a été défini à la suite d'une série d'essais portant :

- sur la préparation du matériel végétal lors des ensemencements, afin de limiter les phénomènes de brunissement très souvent mentionnés dans les tentatives antérieures de culture de tissu de cocotier ;
- sur la composition des milieux de culture et, en particulier, sur les teneurs en auxines indispensables à la formation des cals.

Après 1 à 2 semaines de culture, les fragments de folioles présentaient une croissance d'autant plus importante qu'ils occupaient sur l'arbre une position plus proche de l'apex. Dans la plupart des cas, et en particulier dans le cas des explants issus d'individus jeunes, les fragments restaient sains et on observait peu ou pas de brunissement (Fig. 1). On a pu observer après environ 4 semaines de culture l'apparition de légères proliférations de type cicatriciel au niveau des tissus lésés (coupes, blessures) (Fig. 1).

(1) Communication présentée par le Dr Senawi Tamir à la Conférence nationale du Cocotier à Kuala Lumpur (Malaisie), 25-26 mai 1982, organisée par le MARDI (Malaysian Agricultural Research and Development Institute).

Ce travail a été réalisé dans le cadre d'une convention ORSTOM-I.R.H.O., au laboratoire de Physiologie végétale des Services scientifiques centraux de l'ORSTOM, 72, 74, route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

(2) Chercheur I.R.H.O. (11, square Pétrarque, 75016 Paris — France)

(3) Chercheur ORSTOM à Bondy (France).

Deux à trois mois après la mise en culture, des nodules apparaissaient à la face inférieure des folioles (Fig. 2). Il s'agissait le plus souvent de formations bien individualisées, parfois attachées les unes aux autres. Si leur croissance était relativement stationnaire, leur nombre par contre augmentait rapidement (Fig. 3). Parfois ces cals pouvaient présenter un aspect plus diffus (Fig. 4).

Les premiers examens histologiques ont montré que les cals apparaissaient le plus souvent au niveau des nervures secondaires sous forme de massifs méristématiques (Fig. 5 et 6).

Le pourcentage d'obtention des cals variait avec l'âge physiologique de l'explant et de façon significative avec la concentration en auxine dans le milieu de culture. Pour la concentration optimale de cette phytohormone, le pourcentage d'explants porteurs de nodules après 4 ou 5 mois de culture était de 50 p. 100 pour les jeunes individus et de 20 p. 100 pour les arbres adultes.

Cette différence de comportement semble principalement due au fait que les explants prélevés sur arbre adulte sans léser l'apex étaient plus âgés que ceux issus de jeunes plants (2 ou 5 ans).

Après isolement et repiquage des cals, des formations nouvelles sont apparues dans un certain nombre de cas. Il s'agissait de formations blanches aux contours bien délimités (Fig. 7) ; elles devenaient rapidement chlorophylliennes et présentaient toutes les caractéristiques morphologiques et histologiques d'embryons somatiques (Fig. 9). Maintenus sur leur milieu de culture d'obtention, certaines se

sont multipliées, très probablement par l'intermédiaire d'un phénomène d'embryogenèse adventive, et on obtenait une petite masse composée de plusieurs embryoides attachés les uns aux autres (Fig. 8).

Ces embryoides ont été obtenus dans un délai d'environ 6 mois après la mise en culture des explants foliaires issus de plants âgés de 2 et 5 ans.

DISCUSSION ET CONCLUSION

Ces premiers résultats mettent en évidence les possibilités d'obtention de néoformations à partir de fragments d'organes de cocotier, dans un délai relativement court.

L'utilisation d'explants de jeunes feuilles permet de disposer d'un effectif important de tubes de culture par arbre d'origine et ceci sans tuer l'individu donneur. La méthode utilisée est simple puisqu'un seul repiquage a été nécessaire depuis le prélèvement jusqu'à l'apparition des embryoides.

Par ailleurs, certaines observations nous conduisent à penser qu'il est possible d'obtenir la formation des embryoides sur le fragment foliaire. Dans ce cas, la phase tissu différencié serait particulièrement courte, permettant ainsi de limiter les risques d'obtention de mutants ou de « variants ».

Les travaux se poursuivent afin d'obtenir le développement des embryoides en jeunes plantes et de réaliser le même processus à partir de matériel végétal issu d'arbres adultes sélectionnés ; seule l'étape d'obtention des cals nodulaires ayant été franchie actuellement.

RÉFÉRENCES

- [1] AHÉE J. *et al.* (1981). — La multiplication végétative *in vitro* du palmier à huile par embryogenèse somatique (trilingue fr.-angl.-esp.). *Oléagineux*, 36, N° 3, p. 113-118.
- [2] APAYATJIRUT P. & BLAKE J. (1977). — Tissue culture of stem explants of coconut (*Cocos nucifera* L.) (bilingue angl.-fr.). *Oléagineux*, 32, N° 6, p. 267-270.
- [3] DAVIS J. A. (1969). — Clonal propagation of the coconut. *World Crops*, 21, p. 253-255.
- [4] DE GUZMAN E. V., DEL ROSARIO A. G. & EUSEBIO E. C. (1971). — The growth and development of coconut « makapuno » embryo *in vitro*. III. Resumption of root growth in high sugar media. *Philipp. Agricult.*, 53, 10, p. 566-579.
- [5] DE GUZMAN E. V., DEL ROSARIO A. G. & UBALDE E. M. (1978). — Proliferative growths and organogenesis in coconut embryo and tissue cultures. *Philipp. J. Cocon. Stud.*, 3, p. 1-10.
- [6] DE GUZMAN E. V. & DEL ROSARIO A. G. (1979). — *Fifth Session of the FAO Technical Working Party on Coconut Production, Protection and Processing*. Manila, Philippines, 3-8 December.
- [7] EEUWENS C. J. (1976). — Mineral requirements for growth and callus initiation of tissue explants excised from mature coconut palms (*Cocos nucifera*) and cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 36, p. 23-28.
- [8] EEUWENS C. J. (1978). — Effects of organic nutrients and hormones on growth and development of tissue explants from coconut (*Cocos nucifera*) and date (*Phoenix dactylifera*) palms cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.*, 42, p. 173-178.
- [9] EEUWENS C. J. & BLAKE J. (1977). — Culture of coconut and date palm tissue with a view to vegetative propagation. *Acta hort.*, 78, p. 277-286.
- [10] MURASHIGE T. (1974). — Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25, p. 135-166.
- [11] NOERHADI E. & FORUAN N. L. (1975). — Embryo development and the growth of growing tissues of coconut seedlings *in vitro*. *FAO consultation : problems in palm tree breeding*, Rome, 29 sept.-1^{er} oct.
- [12] PANNETIER C., ARTHUIS P. et LIEVOUX D. (1981). — Néoformation de jeunes plantes d'*Elaeis guineensis* à partir de cals primaires obtenus sur fragments foliaires cultivés *in vitro* (trilingue fr.-angl.-esp.). *Oléagineux*, 36, N° 3, p. 119-122.
- [13] RABÉCHAULT H. et MARTIN J. P. (1976). — Multiplication végétative du palmier à huile à l'aide de tissus foliaires. *C. R. Acad. Sci., Paris, Sér. D*, p. 1735-1737.
- [14] SUDASRIP H., KAAAT H. & DAVIS J. A. (1978). — Clonal propagation of the coconut via the bulbils. *Philipp. J. Cocon. Stud.*, 3, p. 5-14.

Légendes de la planche ci-contre

- FIG. 1. — Fragment de foliole présentant des proliférations de type cicatriciel après environ 1 mois de culture (Leaflet fragment with scar-type proliferations after about 1 month's culturing — Fragmento de foliolo con proliferaciones de tipo cicatricial al cabo de poco más o menos 1 mes de cultivo) [× 3].
- FIG. 2. — Apparition de cals nodulaires sur un explant de plant de pépinière — après 2 mois de culture (Appearance of nodular calluses on an explant of a nursery plant — after 2 month's culturing — Aparición de callos nodulares en un explante de plantón de semillero — al cabo de 2 meses de cultivo) [× 3].
- FIG. 3. — Cals nodulaires après environ 80 jours de culture (Nodular calluses after about 80 day's culturing — Callos nodulares después de unos 80 días de cultivo) [× 3,8].
- FIG. 4. — Cals à aspect plus diffus après environ 80 jours de culture (Calluses of diffuse appearance after about 80 day's culturing — Callos de aspecto más difuso después de unos 80 días de cultivo) [× 3,8].
- FIG. 5, 6. — Coupes dans un explant : 5 = apparition des 1^{res} cellules en division près de la nervure [× 22,9], 6 = stade plus avancé, formation d'un massif méristématique [× 40]. (Sections of an explant : 5 = appearance of dividing cells near the vein ; 6 = more advanced stage, formation of a meristematic mass — Cortes en un explante : 5 = aparición de las primeras células en división cerca de la nervadura ; 6 = estado más adelantado, formación de un macizo meristemático).
- FIG. 7. — Cals isolés, formation d'un embryotide (Isolated calluses, formation of an embryotide — Callos aislados, formación de un embriotide) [× 2,5].
- FIG. 8. — Masse composée de plusieurs embryoides (Mass composed of several embryoids — Masa compuesta por varios embrioides) [× 6].
- FIG. 9. — Coupe dans un jeune embryotide (Section of a young embryotide — Corte en un joven embriotide) [× 53,7].



Fig. 1 Δ



Fig. 2 Δ

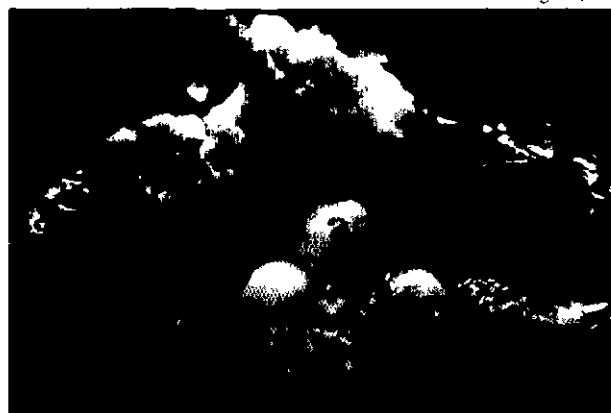


Fig. 3 ∇



Fig. 4 ∇

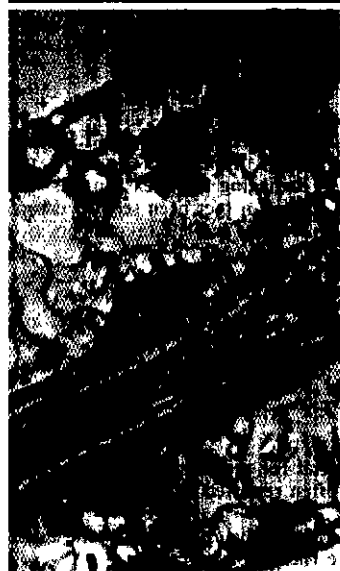


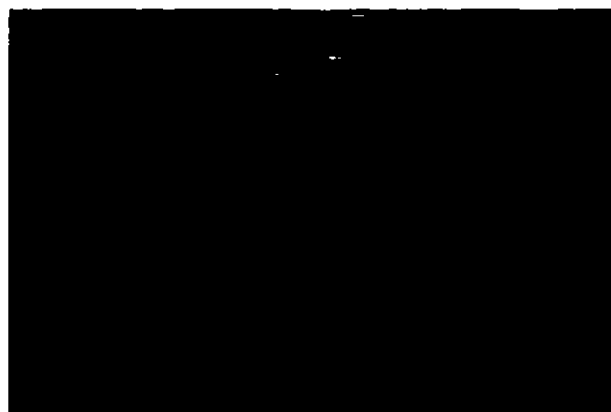
Fig. 5 Δ



Fig. 6 Δ



Fig. 7 Δ



\triangleleft Fig. 8



Fig. 9 ∇

SUMMARY

First results of somatic embryo production from leaf tissue of coconut, *Cocos nucifera* L.

C. PANNETIER and J. BUFFARD-MOREL, *Oléagineux*, 1982, 37, N° 7, p. 349-354.

It has been shown to be possible to induce somatic embryogenesis in coconut leaf tissue. Explants of young leaves taken from both immature and adult trees produced nodular callus. The evolution of the explants is described. Formation of embryoids was achieved, using nursery plants and 5-year-old trees, in a minimum 6 months from the start of explant culture.

RESUMEN

Primeros resultados sobre la producción de embriones somáticos a partir de tejidos foliares de cocotero, *Cocos nucifera* L.

C. PANNETIER y J. BUFFARD-MOREL, *Oléagineux*, 1982, 37, N° 7, p. 349-354.

Se ha evidenciado la posibilidad de inducir una embriogénesis somática a partir de tejidos foliares de cocotero. Explantes de hojas jóvenes, procedentes tanto de individuos jóvenes como de árboles adultos, dieron origen a callos nodulares. Se describe la evolución de explantes. Se obtuvo la formación de embrioides a partir de plantones de semillero y de árboles de 5 años, en un plazo mínimo de 6 meses después de la puesta en cultivo de explantes.

First results of somatic embryo production from leaf tissue of coconut, *Cocos nucifera* L. (1)

C. PANNETIER (2) and J. BUFFARD-MOREL (3)

with the technical collaboration of D. LIEVOUX

INTRODUCTION

The productivity of a coconut plantation could be increased significantly if high-yielding homogeneous material were available. Now, the coconut, usually cross-fertilized, is only reproduced sexually at the moment.

A few rare cases of phenomena which might lead to vegetative propagation have been reported: branching, shoots, transformation of spathes or flowers into vegetative shoots [Davis, 1969]. In the last case, attempts to get the bulbils to root were successful [Sudasrip *et al.*, 1978]. Nevertheless, it did not prove possible to work out a routine vegetative propagation method.

Tissue culture *in vitro* techniques have shown their efficiency in the propagation of many species [Murashige, 1964]; consequently, their use for the vegetative propagation of coconut appeared of great interest. Indeed, work was done in several countries using different types of explants. Let us mention: embryos [De Guzman *et al.*, 1971, 1978; Noerhadi, 1975] and fragments of stems and inflorescences [Eeuwens, 1976 and 1978; Apavatjrit and Blake, 1977; Eeuwens and Blake, 1978; De Guzman and Del Rosario, 1979].

In this paper we present the first results of the research which started at the beginning of 1981. They concern the formation of calluses and the induction of somatic embryogenesis using leaf tissue. A method of this type had already been worked out for oil palm [Rabehault and Martin, 1976; Ahee *et al.*, 1981].

We sought to induce the production of neoformations in the shortest possible time from the start of culture of the explants, so as to arrive at a rapid method offering the maximum guarantee as to the conformity of the neoformed material. Results have recently been obtained with oil palm in this respect [Pannetier *et al.*, 1981].

RESULTS

Young leaves were sampled on individuals of the I.R.H.O. hybrid PB-121 (West African Tall × Malayan Yellow Dwarf). The samples were taken without damaging the apex; in this way the trees can go on growing and have in fact been seen to do so. The explants were made of fragments of leaflets taken from two main types of individuals: *a*) nursery seedlings or 5-year-old plants which had been raised in a glasshouse; *b*) mature trees chosen for their yield criteria. Samples of the latter were taken on the Marc Delorme coconut Station in the Ivory Coast, and sent to France straight away.

400 explants per nursery plant, 800 of the 5-year-old individual, and more than 1 200 per adult tree were cultured.

The conditions of culture were defined after a series of tests concerning:

- the preparation of the material for seeding so as to avoid the problem of browning very often reported in previous attempts at coconut tissue culture;
- the composition of the culture media, particularly the auxin content indispensable to the formation of calluses.

After 1 or 2 weeks of culturing, the growth of the leaflet fragments was all the greater in that they came from a point closer to the apex on the original tree. In most cases, the fragments remained healthy and showed little or no browning (Fig. 1). After 4 weeks' culture, slight proliferations of scar type formed on damaged tissues (cuts, wounds) (Fig. 1).

Two or three months after culture started, nodules appeared on the lower face of the leaflets (Fig. 2). They were mostly small, well-individualized formations, sometimes joined together; whilst their growth remained almost stationary, their number increased rapidly (Fig. 3). Sometimes these calluses had a more diffuse appearance (Fig. 4).

The first histological examinations showed that they usually appeared at the level of the secondary veins in the form of meristematic masses (Fig. 5 and 6).

The percentage of calluses obtained varied according to the physiological age of the explant and the quantity of auxin in the culture medium. At the optimum concentration of this hormone, 50 p. 100 of the explants from young plants and 20 p. 100 of those from adult ones bore nodules after 4-5 months' culturing.

(1) Communication presented by Dr. Senawi Tamin at the National Coconut Conference, Kuala Lumpur, Malaysia, 25-26 May 1982, organized by the Malaysian Agricultural Research & Development Institute (MARDI). This work is done under an ORSTOM-I.R.H.O. agreement at the Plant Physiology Laboratory of the ORSTOM S.S.C.; 72, 74, route d'Aulnay, 93140 Bondy (France).

(2) I.R.H.O. Research Worker (11, square Pétrarie, 75016 Paris — France).

(3) ORSTOM Research Worker, Bondy (France)

This difference in performance seems due mainly to the fact that the leaf fragments taken from adult trees without damaging the apex were older than those isolated from young plants (2 or 5 months).

After isolation and re-seeding of the calluses new structures appeared in a certain number of cases. These were white formations of well-marked outline (Fig. 7) which rapidly became chlorophyllian and had all the morphological and histological characteristics of somatic embryos (Fig. 9). Kept on the culture medium on which they were obtained, some multiplied, very probably through a phenomenon of somatic embryogenesis, producing a small mass made up of several embryoids joined together (Fig. 8).

It took about 6 months from the start of culture of the leaf explants taken from plants aged 2 and 5 years to obtain these embryoids.

DISCUSSION AND CONCLUSION

These first results show that it is possible to obtain neoformations from fragments of coconut organs in a relatively short time.

The use of explants of young leaves makes it possible to set up a large number of culture tubes for each original tree without killing the donor. The method used is simple, since only one reseedling is necessary from sampling to the appearance of the embryoids.

In other respects, certain observations suggest that it would be possible to achieve embryoid formation directly on the leaf fragment; in this case the dedifferentiated tissue phase would be particularly short, thus limiting the risks of getting mutants or 'variants'.

The work is being pursued to achieve the development of the embryoids into young plants, and also to carry out the same process using material from selected adult trees; only the callus production phase has yet been got over.

Primeros resultados sobre la producción de embriones somáticos a partir de tejidos foliares de cocotero, *Cocos nucifera* L. (1)

C. PANNETIER (2) y J. BUFFARD-MOREL (3)
con colaboración técnica de D. LIEVOUX

INTRODUCCIÓN

La productividad de una plantación de cocoteros podría incrementarse de modo significativo, si fuera disponible un material homogéneo altamente productivo. Ahora bien, el cocotero que es alógeno por lo general, sólo se multiplica hasta la fecha por vía sexual.

Se advirtió unos casos excepcionales de fenómenos que pueden llevar a una propagación vegetativa: ramificaciones, retoños, transformaciones de espigas o de flores en yemas vegetativas [Davis, 1969]. Dentro de este último caso, intentos de arraigo han podido llegar a un resultado [Sudasrip *et al.*, 1978]. Sin embargo, no se ha podido desarrollar ningún método de propagación vegetativa rutinaria.

Las técnicas de cultivo *in vitro* han mostrado su eficacia en la propagación de numerosas especies [Murashige, 1964]; su utilización con vistas a la propagación vegetativa del cocotero resultó por lo tanto muy interesante. Además se llevaron a cabo trabajos en varios países a partir de diversos tipos de explantes. Conviene citar: los embriones [De Guzman *et al.*, 1971, 1978, Noerhadi, 1975] y los fragmentos de tallos e inflorescencias [Eeuwens, 1976 y 1978; Apavatjyt y Blake, 1977; Eeuwens y Blake, 1978; De Guzman y Del Rosario, 1979].

Presentamos aquí los primeros resultados de investigaciones acometidas a principios de 1981. Se refieren a la formación de callos y a la inducción de una embriogénesis somática a partir de tejidos foliares. Un método de este tipo ha sido desarrollado anteriormente sobre la palma africana [Rabéchault, Martin, 1976; Ahée *et al.*, 1981].

Procurábamos inducir la producción de neoformaciones cuanto antes después de la puesta en cultivo de los explantes, para llegar a un método rápido que ofreciera las mayores garantías en cuanto a conformidad del material vegetal neoformado. Dentro de este enfoque, se obtuvo resultados recientemente en la palma africana [Pannetier *et al.*, 1981].

RESULTADOS

Se tomaron hojas jóvenes en individuos procedentes del híbrido PB-121 (Enano Amarillo Malayo x Grande Oeste Africano) creados por el I.R.H.O.

La toma de muestras se hizo sin lesionar el ápice, siendo posible el brote del árbol, que efectivamente ha sido observado. Los explantes estaban constituidos por fragmentos de folíolos obtenidos a partir de dos tipos principales de individuos: a) plantones de semillero o plantón de 5 años que se habían desarrollado en invernadero; b) árboles adultos escogidos por sus criterios de producción. Dentro de este último caso, el material ha sido tomado en Costa de Marfil en la estación Cocotero Marc-Delorme, y remitido a Francia en el plazo más breve.

Se ha podido poner en cultivo 400 explantes por plantón de semillero, 800 para el individuo de 5 años de edad y más de 1 200 por árbol adulto.

Se definió un conjunto de condiciones de cultivo, como consecuencia de una serie de ensayos sobre:

(1) Comunicación presentada por el Dr Senawi Tamim en la Conferencia Nacional del Cocotero, celebrada los 25-26 mayo 1982 en Kuala Lumpur (Malasia), organizada por el MARDI (Malayan Agricultural Research and Development Institute).

Esta labor ha sido realizada dentro de un convenio ORSTOM-I.R.H.O., en el Laboratoire de Physiologie végétale de los Servicios científicos centrales del ORSTOM; 72, 74, route d'Aulnay, 93140 Bondy (Francia).

(2) Investigador del I.R.H.O. (11, square Pétrarque, 75016 Paris — France).

(3) Investigador del ORSTOM, Bondy (France)

- la preparación del material vegetal en las siembras, a fin de limitar los fenómenos de pardeamiento que se vienen advirtiendo muchas veces en los intentos anteriores de cultivo de tejido de cocotero,
- la composición de los medios de cultivo, particularmente los contenidos de auxinas que son indispensables para la formación de los callos.

Al cabo de 1 a 2 semanas de cultivo, los fragmentos de folíolos ofrecían un crecimiento tanto más importante cuanto más próxima al ápex era su posición en el árbol. En la mayoría de los casos, particularmente en el caso de explantes procedentes de individuos jóvenes, los fragmentos quedaban sanos y se observaba un pardeamiento muy leve o nulo (Fig. 1). Ha sido posible observar después de unas 4 semanas de cultivo, la aparición de proliferaciones leves de tipo cicatricial al nivel de tejidos lesionados (cortes, heridas) (Fig. 1).

A los dos o tres meses después de la puesta en cultivo, aparecían nódulos en el envés de los folíolos (Fig. 2). Se trataba las más veces de formaciones bien individualizadas, a veces pegadas unas con otras. Si bien su crecimiento era relativamente estacionario, en cambio su número aumentaba rápidamente (Fig. 3). Estos callos podían a veces presentar un aspecto más difuso (Fig. 4).

Los primeros exámenes histológicos han mostrado que los callos aparecían las más veces al nivel de las nervaduras secundarias bajo la forma de macizos meristemáticos (Fig. 5 y 6).

El porcentaje de obtención de los callos variaba con la edad fisiológica del explante, y de modo significativo con la concentración de auxina en el medio de cultivo. Para la concentración óptima de esta fitohormona, el porcentaje de explantes portadores de nódulos después de 4 a 5 meses de cultivo era de un 50 % para los individuos jóvenes y de 20 % para los árboles adultos.

Parece que esta diferencia de comportamiento se debe principalmente a que los explantes tomados en un árbol adulto sin lesionar el ápex eran más viejos que los procedentes de plantones jóvenes (2 o 5 años).

Después de aislar y trasplantar los callos, formaciones nuevas aparecieron en cierto número de casos. Se trataba de formaciones blancas de contornos bien delimitados (Fig. 7); se volvían rápidamente clorofílicas y presentaban todas las características morfológicas e histológicas de embriones somáticos (Fig. 9). Algunas han quedado mantenidas en su medio de cultivo de obtención, multiplicándose, muy probablemente por un fenómeno de embriogénesis adventicia y obteniéndose una pequeña masa compuesta por varios embrioides pegados unos con otros (Fig. 8).

Se obtuvo estos embrioides en un plazo de unos 6 meses después de la puesta en cultivo de explantes foliares procedentes de plantones de 2 a 5 años de edad.

DISCUSIÓN Y CONCLUSIÓN

Estos primeros resultados evidencian las posibilidades de obtención de neoformaciones a partir de fragmentos de órganos de cocotero, en un plazo relativamente breve.

La utilización de explantes de hojas jóvenes permite disponer de un número elevado de tubos de cultivo por árbol de origen, esto sin matar el individuo donador. El método empleado es sencillo, puesto que se ha necesitado un solo trasplante desde que se sacó la muestra hasta la aparición de embrioides.

Por otra parte, ciertas observaciones nos hacen pensar que es posible obtener la formación de embrioides en el fragmento foliar. En tal caso la fase de tejido desdiferenciado sería especialmente breve, permitiendo así que se limitara el riesgo de obtención de mutantes o « variantes ».

Se están prosiguiendo los trabajos para lograr el desarrollo de embrioides en plantones jóvenes y para realizar el mismo proceso a partir de material vegetal procedente de árboles adultos seleccionados; sólo ha sido superada hasta la fecha la etapa de obtención de los callos nodulares.

